

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000753

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 04 03242
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 June 2005 (13.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

23 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

CREÉ PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

INPI Indigo 0 825 83 85 87

0.15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65.

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

BR1

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

DB 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈGES DATE 29 MARS 2004 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0403242 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 29 MARS 2004		Remis à l'INPI
Vos références pour ce dossier (facultatif) BFF 04P0143		

Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N° Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N° Date <input type="text"/>

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé d'amélioration des plantes.		
--	--	--

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		GENOPLANTE-VALOR
Prénoms		
Forme juridique		Société par actions simplifiée
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	93 rue Henri Rochefort
	Code postal et ville	9110215 EVRY CEDEX
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)
Adresse électronique (facultatif)		
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

Remplir impérativement la 2^{me} page

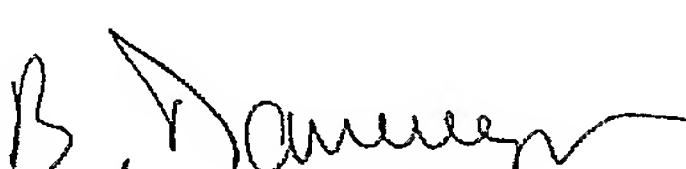
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**

BR2

REMISE DES PIÈCES à l'INPI	
DATE	29 MARS 2004
LIEU	75 INPI PARIS B
LIEU	
0403242	
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 191203

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		CABINET LAVOIX
Nationalité		
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves
	Code postal et ville	75141 PARIS CEDEX 09
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 53 20 14 20
N° de télécopie (facultatif)		01 53 20 14 91
Adresse électronique (facultatif)		brevets@cabinet-lavoix.com
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
B. DOMENEGO N° 00-0500		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

La présente invention concerne un procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon produits dans les plantes et/ou pour augmenter la teneur des plantes en amidon.

5 L'amidon est le polyoside de stockage énergétique chez les végétaux. Il constitue le principal apport calorique de l'alimentation animale et humaine et est également une source majeure de matière première végétale pour des utilisations non alimentaires. L'amidon est composé de deux fractions polysaccharidiques distinctes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose, qui
10 représente la fraction minoritaire de l'amidon, est constitué de résidus glucose unis par des liaisons α -1,4, et présente moins de 1% de ramifications. L'amylopectine, qui représente la fraction majoritaire de l'amidon, est constituée de résidus glucose unis par des liaisons α -1,4, et présente environ 5% de ramifications, constituées par des résidus de glucose liés au polymère
15 principal par une liaison α -1,6. La distribution asymétrique de la ramification de l'amylopectine est responsable de la croissance illimitée des molécules d'amidon et par conséquent des grains d'amidon, et rend également compte de la plupart des propriétés physico-chimiques de l'amidon.

20 La biosynthèse de l'amidon dépend d'une voie métabolique dont les étapes biochimiques principales sont la synthèse d'ADP-glucose suivie par le transfert de ce précurseur en position α -1,4 sur un glucane par des (ADP-glucose :1,4- α -D-glucane 4- α -D-glucosyl)transférases, le polymère formé étant ramifié par l'action des enzymes dites de ramification ou de « branchement » : les 1,4- α -D-glucane 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transférases.

25 La dégradation de l'amidon implique plusieurs enzymes, dont l' α -amylase (endoamylase), la β -amylase (exoamylase), l'amyloglucosidase, et l'alpha-glucane phosphorylase (amidon phosphorylase).

30 Le rôle de ces diverses enzymes de dégradation de l'amidon n'est pas clairement établi. Par exemple, il a été rapporté qu'une expression réduite d'une phosphorylase dans les feuilles, par répression par antisens, n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation d'amidon, chez la pomme de terre (Sonnewald et al., 1995).

Puisque la répression par antisens de l'activité α -glucane phosphorylase n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation d'amidon dans les feuilles de pommes de terre transgéniques, les auteurs en ont conclu que la rupture de l'amidon n'était pas catalysée par les phosphorylases.

5 Le brevet US 5,998,701 divulgue que la réduction de la teneur en phosphorylase dans les tubercules de pomme de terre a pour conséquence une diminution substantielle de l'accumulation des sucres, ce qui peut être mis à profit pour allonger les durées de stockage des tubercules.

Le brevet US 6,353,154 propose, quant à lui, de modifier les activités de
10 l'amidon phosphorylase chez les plantes, en particulier le maïs, dans le but d'obtenir une synthèse d'amidon qui serait modifié dans sa structure.

Les inventeurs ont maintenant mis en évidence que l'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase induit une augmentation significative de la
15 taille des grains d'amidon produits dans les plantes, ainsi que de la quantité d'amidon accumulé.

Sur cette base, la présente invention fournit un procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

20 Ce procédé est particulièrement avantageux pour augmenter les rendements lors de l'extraction et de la purification de l'amidon à l'échelle industrielle. En effet, les grains d'amidon les plus petits sont généralement perdus au cours des lavages lors des processus d'extraction et de purification. Une augmentation de la taille des grains permet d'éviter la perte d'une partie
25 des grains d'amidon.

La présente invention fournit également un procédé pour augmenter la teneur en amidon d'une plante ou partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

Il faut comprendre que l'augmentation de la taille des grains d'amidon et
30 l'augmentation de la teneur en amidon ne sont pas nécessairement liées, à savoir qu'*a priori* l'augmentation de la teneur en amidon n'implique pas

obligatoirement une augmentation de la taille des grains d'amidon, et vice versa.

La présente demande montre l'existence d'une interaction entre l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement.

5 La phosphorylase, le cas échéant en interaction avec une glycogénine (WO 03/014365), amorcerait l'initiation de l'amidon en fournissant l'amorce appropriée vis à vis des enzymes de branchement et de l'amidon synthase.

Sans pour autant être liés par cette théorie, on peut émettre une hypothèse pour expliquer l'augmentation de la taille moyenne des grains 10 d'amidon dans les plantes dans lesquelles l'amidon phosphorylase est inactivée. Selon cette théorie, du fait de l'inactivation de la phosphorylase, seule l'amidon synthase (notamment SS 5 chez Arabidopsis, SS I chez le maïs) pourrait interagir avec la glycogénine et initier la synthèse d'amidon. L'interaction plus faible avec la glycogénine, voire également une expression 15 plus tardive, résulterait en un retard dans l'initiation de la synthèse de l'amidon, et donc du nombre de granules produits (initiés). Comme le nombre de molécules d'amidon initiées est moins important mais que les substrats nécessaires à la synthèse de l'amidon sont présents au même niveau, on obtient des grains plus gros car utilisant la même quantité de substrat pour un 20 nombre réduit de granules.

L'invention fournit également un procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

25 L'invention fournit par ailleurs un procédé pour l'obtention de plantes, de tissus de plante ou parties de plante à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

Le terme "tissu de plante" fait référence à n'importe quel tissu d'une 30 plante, dans une plante ou dans une culture. Ce terme inclut des plantes entières, des cellules de plantes, des organes de plantes, des graines de

plantes, des protoplastes, des cals, des cultures de cellules et toutes autres cellules de plantes organisées en tant qu'unité fonctionnelle et/ou structurelle.

L'invention concerne aussi tout tissu de plante susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention ainsi que les plantes transgéniques le comprenant.

De plus, les graines issues des plantes obtenues selon l'un des procédés mentionnés selon l'invention caractérisées en ce qu'elles ont une taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée rentrent dans le cadre de la présente invention.

10 Les « amidon phosphorylases », également connues sous le nom de « alpha-glucane phosphorylases », ont été décrites dans de nombreuses plantes, par exemple la fève, la pomme de terre (Swissprot P04045), la betterave, l'épinard, le maïs (WO 98/40503), le petit pois ainsi que le riz (EMBL n° d'accès D23280 ou Q9AUV8), et le blé (EMBL AAQ73181).

15 La séquence génomique (locus désigné AtPHO-1) codant pour l'amidon phosphorylase *d'Arabidopsis thaliana* est présentée en annexe (SEQ ID N° 1).

L'homme du métier sait comment identifier les phosphorylases à inactiver par exemple par comparaison de séquences entre SEQ ID N°1 avec des séquences d'autres espèces en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) et le programme FastDB avec les paramètres par défauts. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149., 1988, Ala. R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence. Une autre méthode possible repose par exemple sur l'hybridation sélective dans des conditions de fortes stringence telles que définies dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61. En particulier il peut s'agir plus particulièrement de formes alléliques des enzymes citées ci-dessus.

30 L'expression « teneur élevée en amidon » signifie que la plante transgénique obtenue fournit une quantité d'amidon supérieure à une plante de même espèce, non transformée.

« L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase » signifie que le gène est rendu non fonctionnel, c'est-à-dire qu'il ne permet plus ou pratiquement plus l'expression d'une protéine amidon phosphorylase active, la protéine n'étant plus ou pratiquement plus exprimée, ou alors sous une forme 5 mutée non fonctionnelle, incapable d'exercer ses propriétés enzymatiques.

L'inactivation du gène peut être réalisée par tout moyen de l'homme du métier (voir Torneycroft et al., 2001), en particulier par interruption du gène, ou extinction de l'expression génique (« gene silencing »).

Selon un mode de réalisation préféré, on introduit une mutation dans le 10 gène codant pour l'amidon phosphorylase, qui rend ce gène non fonctionnel, à savoir qu'il devient incapable d'exprimer l'enzyme, ou que l'enzyme produite est inactive.

En particulier, la mutation peut consister en une insertion de nucléotide(s), par exemple entre l'exon 6 et l'intron 6 du gène de l'amidon 15 phosphorylase.

L'extinction du gène peut ainsi être réalisée par insertion d'ADN-T.

La séquence SEQ ID N° 2 montre ainsi le gène de l'amidon phosphorylase *d'Arabidopsis thaliana* dans lequel une séquence ADN-T est insérée.

20 L'invention se rapporte également à l'utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifié. La plante obtenue selon l'invention est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

25 L'ADN-T a été utilisé comme mutagène dès la fin des années 80. Chez *Arabidopsis*, qui ne possède pas de transposons endogènes ayant une activité permettant de faire de la mutagenèse insertionnelle, il a été utilisé préférentiellement aux transposons. La bactérie du sol *Agrobacterium* a la capacité de transférer un morceau de son ADN, l'ADN-T, dans le génome nucléaire des cellules de plantes. Cette propriété est très utile pour inactiver des gènes par mutagenèse d'insertion. Les seuls éléments nécessaires sont des répétitions de 24 paires de base, les séquences bordures, qui délimitent la

région à transférer. L'accroissement de l'efficacité des méthodes de transformation a facilité le développement de la génétique inverse.

L'infiltration sous vide de plantes entières a permis d'augmenter l'efficacité de transformation (4 à 5 transformants par plante traitée) de même que la reproductibilité. Récemment, la méthode a encore été simplifiée avec l'apparition du « floral dip ». Les inflorescences sont simplement trempées dans une suspension d'*Agrobacterium* en présence d'un surfactant, le Silwet L-77 et de saccharose. Avec ces différentes méthodes, tous les transformants obtenus sont hémizygotes pour l'ADN-T, ce qui suggère une transformation tardive au cours du développement floral. La cible de transformation a été identifiée comme étant l'ovule en développement. Les mutations létales à l'état homozygote sont maintenues dans la population sous forme de plantes hétérozygotes. On obtient en moyenne une à deux insertions par plante. Les analyses de ségrégation montrent que 57 % des transformants contiennent 1 locus d'insertion, 25 % 2 locus, 8 % 3 locus et 2 % plus de 3. Une analyse moléculaire des mutants étiquetés montrent que ces insertions se font au hasard, sont stables, maintenues dans la descendance et qu'il y a peu de biais d'insertions.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase endogène peut également être obtenue par mutagenèse des cellules de plante, par exemple par irradiation U.V, par un agent mutagène chimique, ou par insertion de transposons.

Les éléments transposables ont la capacité de perturber l'expression de gènes dans lesquels ils sont insérés et de générer des délétions, réarrangements, et mutations au locus cible.

Les transposons ont été les premiers agents insertionnels mutagènes utilisés chez le maïs puis chez le pétunia et *Anthirrhinum*. Contrairement à l'ADN-T, le transposon peut être excisé du gène disrupté en présence d'une transposase. La haute fréquence de réversion de la mutation qui en résulte permet de confirmer qu'elle est induite par le transposon. La remobilisation des transposons permet aussi de générer des mosaïques : un mutant homozygote qui porte une transposase active aura des secteurs somatiques qui ont perdu

le transposon Ds et restauré la fonction du gène. Ceci permet de déterminer le site d'action d'un gène en combinaison avec son patron d'expression. D'autre part, pour les transposons de type Ac/Ds, la plupart des événements de transposition se produisent à des sites génétiquement liés. S'il existe un élément transposable près d'un gène d'intérêt, il pourra donc être remobilisé pour se réinsérer dans le gène ou à proximité (Ito et al., 1999). Il est ainsi possible de faire de la mutagenèse locale dans une région d'intérêt particulier.

Une technique de mutagenèse par transposons qui peut être avantageusement utilisée est la mutagenèse par transposon Mutator confirmée par un criblage en génétique inverse (Bensen et al., 1995 ; Das et al., 1995). Cette technique met en œuvre les étapes consistant à croiser une lignée "Mutator" avec des hybrides des plantes d'intérêt puis à cribler les plantes F1 obtenues par PCR avec une amorce spécifique des transposons et une amorce spécifique de la séquence nucléotidique codant pour l'amidon phosphorylase. Les graines F2 obtenues à partir des plantes criblées F1 permettent d'obtenir des plantes dont le phénotype est alors analysé.

Une autre méthode pour inactiver le gène de l'amidon phosphorylase est l'injection locale d'ARN double brin (RNA interference : RNAi) (Fire, 1999). Les ARN double-brin sont clivés en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides environ qui vont cibler la dégradation des ARNm endogènes homologues (Zamore et al., 2000). L'expression constitutive d'ARN double brin par un transgène mettant en jeu des séquences inversées répétées placées sous le contrôle du promoteur 35S permet d'obtenir une inactivation efficace dans l'ensemble de la plante, y compris dans le méristème (Waterhouse et al., 1998). Cette stratégie est très efficace tout au long du développement des plantes.

L'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase endogène peut être par ailleurs réalisée selon le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) fournir un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique antisens du gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène;
- b) transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;

c) régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, d'une teneur en amidon élevée.

Une autre possibilité pour réduire l'activité de l'amidon phosphorylase 5 dans les cellules des plantes est d'exprimer des ribozymes qui sont des molécules d'ARN qui agissent comme des enzymes catalysant spécifiquement le clivage des transcrits codant pour l'amidon phosphorylase, par des techniques connues de l'homme du métier (EP 321 021).

Il est également possible d'obtenir une plante présentant une altération 10 de l'expression d'amidon phosphorylase par le procédé dit "transswitch" décrit dans WO90/12084.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase peut également être obtenue en infectant les plantes par des virus recombinants dans lesquels une partie de la séquence codante ou du promoteur du gène à inactiver a été 15 introduite (virus-induced gene silencing ou VIGS) (Ratcliff et al., 2001). Pour expliquer ce phénomène, on pense que les molécules virales de polarités positives et négatives produites au cours du cycle de réPLICATION du virus sont reconnus comme des ARN double brin et dégradées en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides qui vont à leur tour déclencher la dégradation des 20 ARNm endogènes homologues. Toutefois, seuls les ARNm endogènes sont totalement dégradés alors que les ARN viraux restent détectables. La présence de petits ARN de 22 nucléotides dérivés des ARN viraux, suggère que les virus qui induisent le VIGS sont également capables d'y résister. Les avantages de cette méthode sont avant tout sa simplicité et la rapidité de sa mise en oeuvre. 25 De plus, il suffit de cloner 23 paires de base d'un gène dans le virus pour cibler spécifiquement son inactivation.

La construction des vecteurs d'expression utilisés (portant par exemple une séquence antisens du gène de l'amidon phosphorylase endogène) ou des 30 ARNi est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs ou des acides nucléiques dans les protoplastes, notamment

après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol en présence de cations divalents (Ca^{2+}).

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de 5 Fromm et al., 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la 10 technique décrite dans l'article de Sanford, (1988).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par biolistique, c'est-à-dire 15 par projection; au moyen d'un canon à particules, de microparticules recouvertes des séquences nucléotidiques à transférer (J. Finner, 1992).

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte 20 cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al., 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la 25 méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al.).

30 Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un

plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

5 Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck et al., (1980), ou le terminateur polyA-NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

10 Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer notamment :

· - le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
15 - le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue ;

20 - les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une expression spécifique dans les graines ;

25 - le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

30 - le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;

- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge ;

30 - le promoteur du gène de γ zéine de maïs (γ zéine) contenu dans le plasmide p γ 63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées conformément à la présente invention, on peut citer celles de la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

La présente invention permet aussi d'obtenir une plante ou partie de plante telle que notamment la pomme de terre, le blé, le maïs ou le riz, produisant des grains d'amidons de taille accrue, ou une teneur élevée en amidon.

Par « partie de plante », on entend notamment les organes de réserve naturellement riches en amidon, tels que les graines ou les tubercules. Par « partie de plante », on entend également les cellules de ladite plante.

L'extraction de l'amidon produit peut être réalisée selon les techniques standard connues de l'homme du métier. La solubilisation de l'amidon est également connue de l'homme du métier et peut être réalisée par trempage et fractionnement du grain d'amidon, ou par exemple par chauffage. De manière alternative, on peut utiliser des enzymes déstructurant l'amidon, telles que les amylases.

L'amidon produit peut également être utilisé dans de nombreuses industries : industrie du papier et du carton, industrie des adhésifs, industrie textile, industrie pharmaceutique (pour la formulation des médicaments), etc.

L'amidon produit peut également subir d'autres modifications, en particulier des modifications chimiques telles qu'un traitement acide, une oxydation, une estérification, etc avant son utilisation.

Cet amidon peut être utilisé pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

30 LEGENDE DES FIGURES :

La figure 1 est un schéma représentant le génome d'*Arabidopsis thaliana*.

La figure 2 est un graphe montrant les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans la lignée mutante par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La figure 3 est une comparaison de profils d'analyse spectrophotométrique d'amidon des lignées sauvage et mutante après chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

La figure 4 est une comparaison de photographies de vues au microscope électronique à transmission, de grains d'amidon (agrandissement x3000).

10

EXEMPLES :

1. Description de la lignée mutante:

Les inventeurs ont étudié les phénotypes d'une lignée mutante d'*Arabidopsis thaliana*, produit par interruption d'un gène de l'amidon phosphorylase (locus désigné AtPHO-1).

Cette lignée (DDS72) est l'une des 50 000 lignées mutantes produites par insertion aléatoire d'ADN-T, comme décrit par Balzergue et al., 2001.

La lignée mutante DDS72 d'*Arabidopsis thaliana* étudiée présente une insertion d'ADN-T à la jonction de l'exon 6 et de l'intron 6 (cf figure 1 et SEQ ID N° 2).

2. Analyse enzymologique de la lignée mutante :

Afin de déterminer l'impact de l'insertion de l'ADN-T au locus AtPHO-1 sur l'activité des amidon-phosphorylases, les inventeurs ont effectué des zymogrammes à partir d'extraits cellulaires de diverses lignées mutantes et sauvages (WS). Les zymogrammes ont été réalisés dans deux conditions différentes.

- Extraction des protéines des feuilles

Les feuilles sont broyées à 4°C à l'aide du Polytron Blender dans le tampon suivant : 50 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl. Le broyat est centrifugé 5

minutes à 13000 rpm à 4°C et on récupère le surnageant contenant les protéines solubles.

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les gels sont réalisés avec les chambres d'électrophorèse MiniProtean 5 Il commercialisés par BioRAD (Richmond, CA, USA). Les gels ont une épaisseur de 1,5 mm. La concentration finale en monomère est de 7,5% (p/v) pour le gel de séparation, il contient également 0,45% de glycogène de foie de lapin ou 0,2% d'amidon de pomme de terre. Il est tamponné par le Tris/HCl 110mM pH 7,2. Le gel de concentration à 2,5% final en monomère est 10 tamponné par le Tris/H₃PO₄ 60mM pH 7,3. Le tampon de migration utilisé pour l'électrophorèse est le Glycine/Tris 40mM pH 8,5.

A 100 µg d'extrait protéique, sont ajoutés 10 µl de Tris/H₃PO₄ 60mM pH 7,3 et 20 µl de tampon de chargement: saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%.

15 La migration se déroule à 4°C durant 2h30 à 15mA et 250V. A l'issue de celle-ci, le gel est équilibré dans le Citrate/NaOH 100mM pH 7,0 pendant 10 minutes avant d'être incubé toute la nuit à température ambiante dans le citrate/NaOH 100mM pH 7,0, Glucose-1-phosphate 50 mM.

20 A cette concentration, les phosphorylase fonctionnent dans le sens de la synthèse des polysaccharides en ajoutant un résidu de glucose en extrémité non-réductrice des glycanes disponibles par l'intermédiaire d'une liaison α-1,4. L'activité est ensuite révélée par coloration du gel à l'iode.

C'est la forme de migration rapide (sur glycogène ou amidon) qui disparaît totalement dans le mutant au locus AtPHO-1.

25

3. Impact de la mutation sur le polysaccharide de réserve :

- Extraction d'amidon des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

30 Les feuilles d'*A. thaliana* sont prélevées en fin de photopériode puis rincées deux fois dans un grand volume d'eau désionisée (afin de retirer les débris non désirés). Dans la glace, on broie le matériel dans 15-25 ml de tampon d'extraction (MOPS 100 mM pH 7,2, EDTA 5 mM, Ethylène glycol 10%) à l'aide du Polytron Blender (broyeur de tissus) jusqu'à obtenir un extrait

bien homogène sans aucun tissu intact. On passe l'extrait 4 x 15 secondes au sonicateur « continu » et entre chaque sonication, on plonge le tube dans la glace. Centrifuger 15 minutes à 3200 g à 4°C. Le culot est repris dans 20 ml de Percoll (Amersham Biosciences) à 90% et centrifugé 40 minutes à 10000 g dans un tube en verre de type Corex. On retire les débris en surface et le surnageant. Le culot d'amidon est rincé cinq fois par de l'eau désionisée avant son analyse.

- Dosage de l'amidon

L'amidon est dosé à l'aide du kit Enzytec commercialisé par Diffchamb (Lyon, France). Les glucanes sont digérés par une amyloglucosidase qui hydrolyse les liaisons O-glycosidiques α -1,4 et α -1,6. Les molécules de glucose ainsi libérées sont ensuite phosphorylées en position 6 par une hexokinase. Le glucose-6-phosphate produit est ensuite oxydé en gluconate-6-P par une G6P déshydrogénase en réduisant le NADP en NADPH. Cette dernière réaction est suivie au spectrophotomètre à 365 nm.

La quantité d'amidon dosée est présente au tableau 1 :

Tableau 1 :

Lignée	Quantité d'amidon (en mg/g de feuilles)
WS (lignée sauvage)	1,16
AtPHO-1 (lignée DDS72)	2,78

La figure 2 présente les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans les différentes lignées par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La structure de l'amidon est ensuite analysée par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

- Fractionnement de l'amidon

Le fractionnement est réalisé par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B (Amersham-Biosciences, Suède).

La colonne possède un diamètre interne de 0,5 cm et une hauteur de 65 cm. Equilibrée dans la soude 10 mM, son débit est de 12 ml/heure. La préparation de l'échantillon d'amidon est effectuée comme suit : on dissout

1,5mg d'amidon natif dans 200 µl de DMSO 100% à 100°C pendant 10 minutes. Le polysaccharide est ensuite précipité par 4 volumes d'éthanol pur à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, le culot d'amidon est dissous dans 500 µl de soude 10 mM puis déposé sur la colonne. Les fractions de 300 µl sont analysées par spectrophotométrie à l'iode.

- Détermination de la λ_{max} du complexe iode-polysaccharide :

La longueur du maximum d'absorbance du complexe formé par l'iode avec les polysaccharides est déterminée par spectrophotométrie. 100 µg d'amidon sont dissous dans le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) 100% durant 10 minutes à 100°C. Cette solution est ensuite ramenée à 10% en DMSO. A 400 µl de cette solution, sont rajoutés 100 µl d'une solution d'iode 0,02% I_2 et 0,2% KI. Le spectre d'absorption est réalisé entre 400 et 700 nm.

On peut également déterminer les quantités de polysaccharides présentes dans chaque fraction à l'aide du kit de dosage Enzytec.

Il ne semble pas y avoir de modification particulière de la structure de l'amidon de la lignée mutante AtPHO-1 si on fait la comparaison entre les deux profils présentés à la figure 3.

20 **4. Analyse de la structure de l'amidon accumulé par la lignée AtPHO-1 par microscopie électronique :**

- Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission

Les échantillons sont inclus dans l'agar à 3% dans l'eau. Ils sont ensuite traités au PATAg : acide périodique-thiosemicarbazide-argent avec un temps d'incubation de 20 minutes dans l'acide périodique. On réalise ensuite une inclusion dans une résine hydrophile (nanoplast) pendant 10 jours avant de consolider la préparation par une inclusion dans une résine LR-White Hard grade. Les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome (microme MT-7000) avec une épaisseur de 60 à 100 nm. Les observations sont effectuées au MET (Jeol 100S) à 80keV (figure 4).

Les images obtenues ont été analysées en repérant les paramètres suivants :

- surface totale,
- diamètre équivalent,
- rapport des différentes longueurs.

5

Les valeurs sont traitées grain par grain.

10

S'agissant de la lignée sauvage, les tailles sont très variées : on note la présence importante d'assez gros grains mais aussi de quelques très petits. Sur 556 grains analysés, le diamètre équivalent moyen est de 1.27 µm. Les grains de forme allongée semblent majoritaires.

S'agissant de la lignée mutante, les grains sont de grosse taille et de formes plus arrondies (convexes) avec une présence de grains anguleux. 256 grains ont été analysés.

15

L'analyse statistique montre que les grains d'amidon de la lignée mutante au locus AtPHO-1 sont en moyenne plus gros que ceux de la lignée sauvage.

Ainsi, deux modifications majeures sont observées en ce qui concerne l'amidon dans la lignée mutante au locus AtPHO-1 chez *A. thaliana* :

20

- 1) une augmentation de la taille moyenne des grains d'amidon dans la lignée mutante,
- 2) une augmentation significative de la quantité d'amidon accumulée dans les feuilles.

25

5. Interaction entre l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement :

30

La phosphorylase est l'une des premières enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon ; qui apparaît dans les amyloplastes de l'endosperme du maïs. L'enzyme continue à présente tout au long du processus de biosynthèse de l'amidon et est la seconde enzyme la plus abondante dans ce processus (après l'enzyme IIb de branchement). Des études de zymogrammes sur gels natifs ont permis d'identifier une zone où trois activités différentes sont présentes (amidon synthase soluble SSS ou SS ; enzymes de branchement SBE, et phosphorylase), suggérant l'existence d'un complexe incluant les

enzymes responsables de ces activités. De plus le fractionnement enzymatique couplé à des zymogrammes a montré une interaction entre l'amidon phosphorylase et les enzymes de branchement.

5

Ces zymogrammes ont fait appel aux conditions suivantes :

Le principe des zymogrammes est soumettre les enzymes à une séparation par électrophorèse, les gels d'électrophorèse étant ensuite trempés dans une solution déclenchant la réaction enzymatique là où l'enzyme a migré.

10 Pour révéler l'amidon phosphorylase, la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme. La réaction enzymatique produit la génération et l'elongation de glucane linéaire. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

15 Pour révéler l'amidon synthase, la solution mise en contact avec le gel contient de l'amylopectine et de l'ADP-glucose, substrats de l'enzyme. La réaction enzymatique produit l'elongation des chaînes d'amylopectine avec l'ADP-glucose. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

20 Pour révéler les enzymes de branchement (SBE), la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme, et une phosphorylase b exogène (de lapin). La réaction enzymatique produit la génération et l'elongation de glucanes linéaires avec le glucose 1-phosphate, glucanes qui sont branchés par les SBE. Des bandes brunes apparaissent là où l'enzyme a migré.

25 D'autres études chez des mutants du maïs et des maïs doubles transgéniques (a/aSBE2b et a/s SSI) ont montré que le domaine des activités enzymatiques multiples observé sur les gels natifs était composé d'au moins la SSI, SBE2b et la phosphorylase. Sans être liés par cette théorie, il est probable au vu de l'interaction de la phosphorylase avec les enzymes directement impliquées dans la biosynthèse d'amidon, que l'amidon phosphorylase est 30 impliquée également dans la biosynthèse de l'amidon.

En raison de l'existence de ce complexe et parce que la phosphorylase apparaît de manière précoce par rapport à l'AGPase ou la SSI dans l'endosperme de maïs, on peut émettre l'hypothèse que l'amidon

phosphorylase, en utilisant la glucose 1-phosphate, génère une chaîne naissante de polymère de glucose qui agirait comme amorce pour les activités des enzymes SBE2b et SSI dans l'amyloplaste du maïs.

BIBLIOGRAPHIE

- An G. (1986), Plant Physiol. 81 : 86-91

5 - Balzergue et al. (2001) Bio Techniques, Vol 30, 496-504

- Bensen et al. (1995), The Plant Cell, Vol. 7, 75-84

- Das et al. (March 1995), The Plant Cell, Vol. 7, 287-294

10

- Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573

- Finner J. et al. (1992), Plant Cell Reports, 11, 323-328

15 - Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811

- Franck et al. (1980) Cell. 21,285-294

- Fromm et al. (1986) Nature, vol. 319, 791-793

20

- Gaubier et al. (1993) Mol. Gen., 238, 409-418

- Ito et al. (1999) Plant J., Vol 17, 433-44.

25 - Jouanin (1987) Plant. Sci., 53, 53-63

- Kay (1987) Science, 236, 1299-1302

- Mc Elroy (1991) Mol. Gen. Genet. 231 : 150-160

30

- Ni et al. (1995) Plant J., 7, 661-676

- Ratcliff et al. (2001) Plant J. 25, 237-245

- Ruiz et al. (1998) Plant Cell 10, 937-946

- Sanford J.C., (1988) Trends in Biotechnology, 6, 299-302

5

- Sonnewald et al., (1995) Plant. Mol. Biol. 27, 567-576

- Thorneycroft et al., (2001) Journal of Experimental Botany, 52, 361 :1593-1601

10

- Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13959-13964

- Watson et al. ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, p 273-292

15

- Zamore et al., (2000) Cell 101, 25-33 Ecole thématique Biologie végétale - 2001

REVENDICATIONS

1. Procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.
5
2. Procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue ou à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.
10
3. Procédé selon la revendication 2, comprenant les étapes consistant à inactiver, par insertion de nucléotide(s), le gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène dans une cellule de plante, et régénérer la plante à partir de la cellule transformée, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, et/ou une teneur en amidon élevée.
15
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la plante est la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.
20
5. Cellule végétale susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendication 2 à 4.
25
6. Plante transgénique comprenant une cellule végétale selon la revendication 5.
30

7. Graine issue de la plante selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle à sa taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée.

5

8. Utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifiée.

10

9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que la plante obtenue est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.



NOPLANTE

1er dépôt

04P0143 SG

1/3

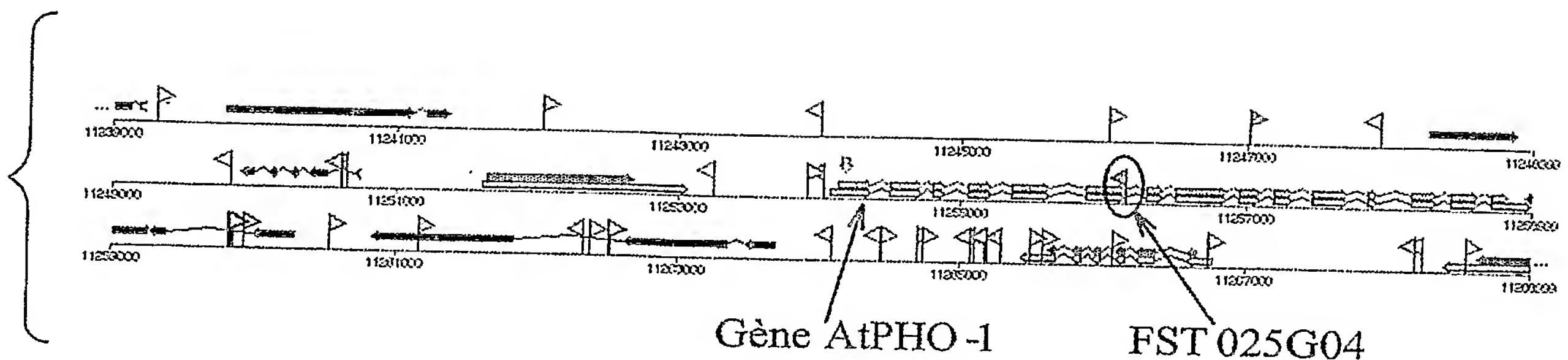


FIG.1

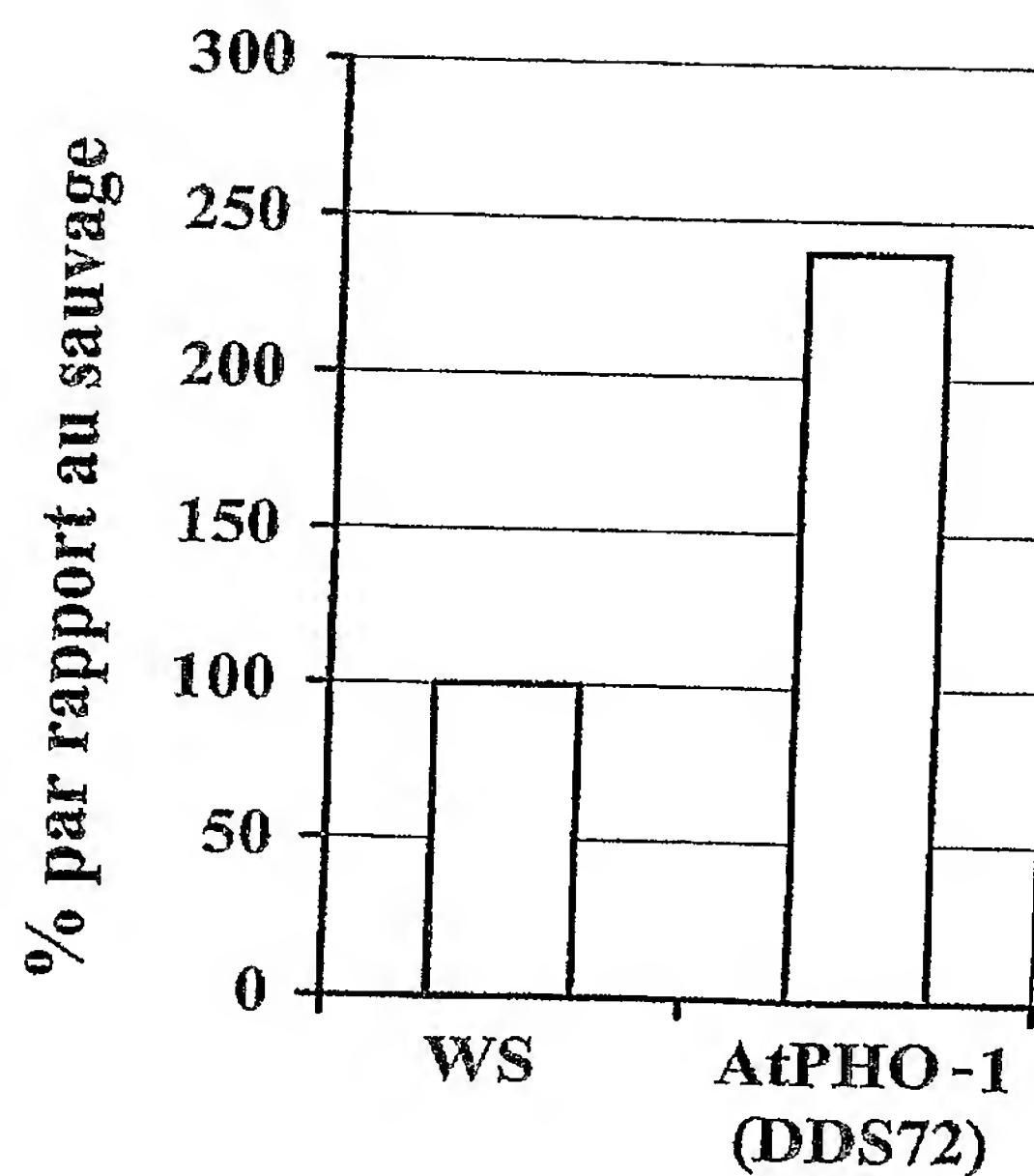
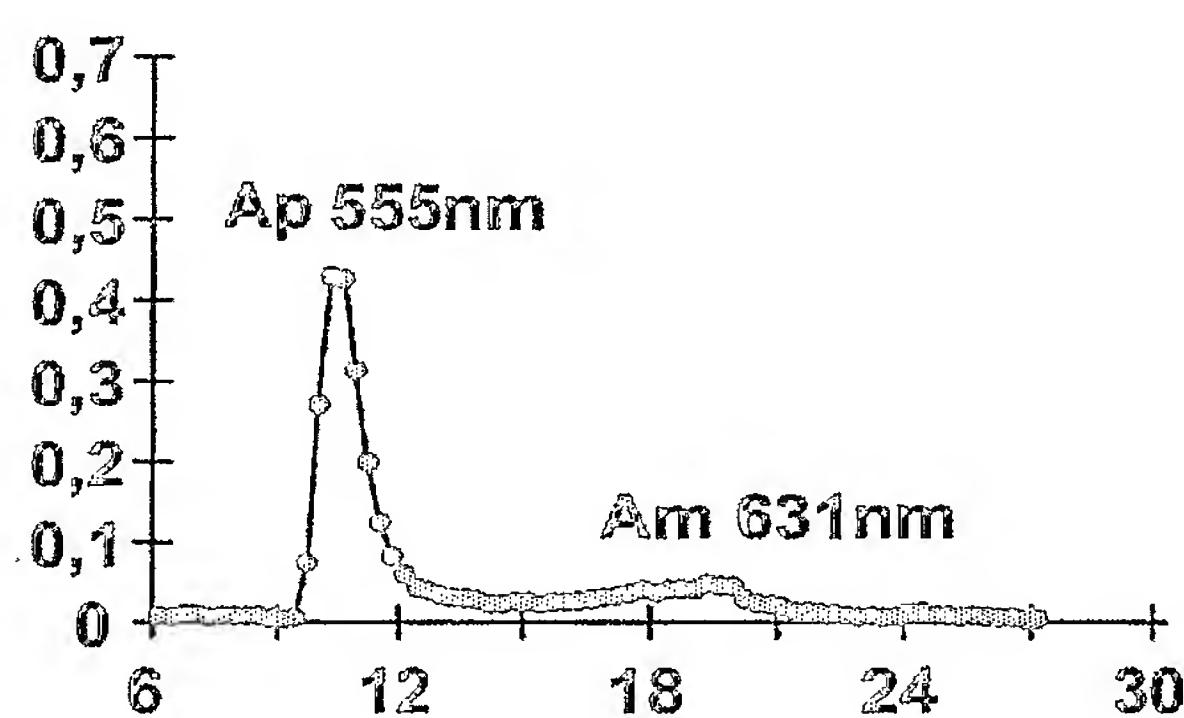


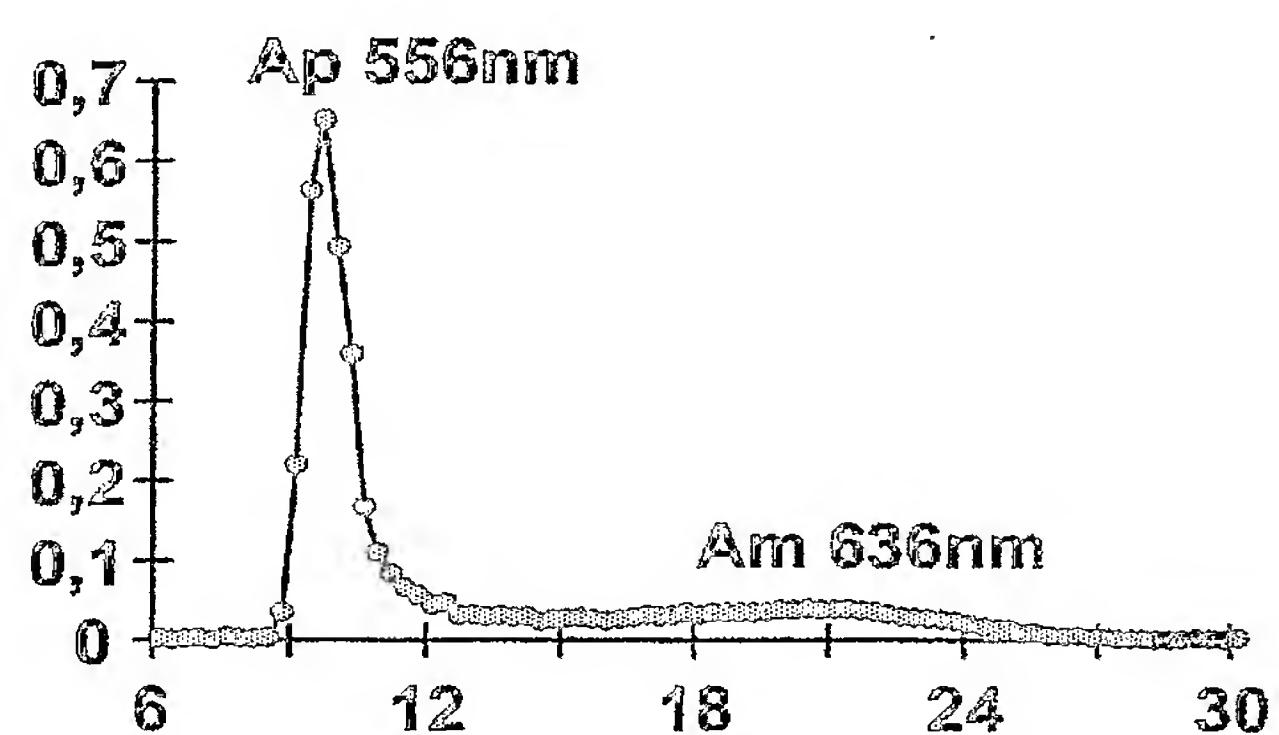
FIG.2

2/3

1,5 mg Amidon WS (sauvage)

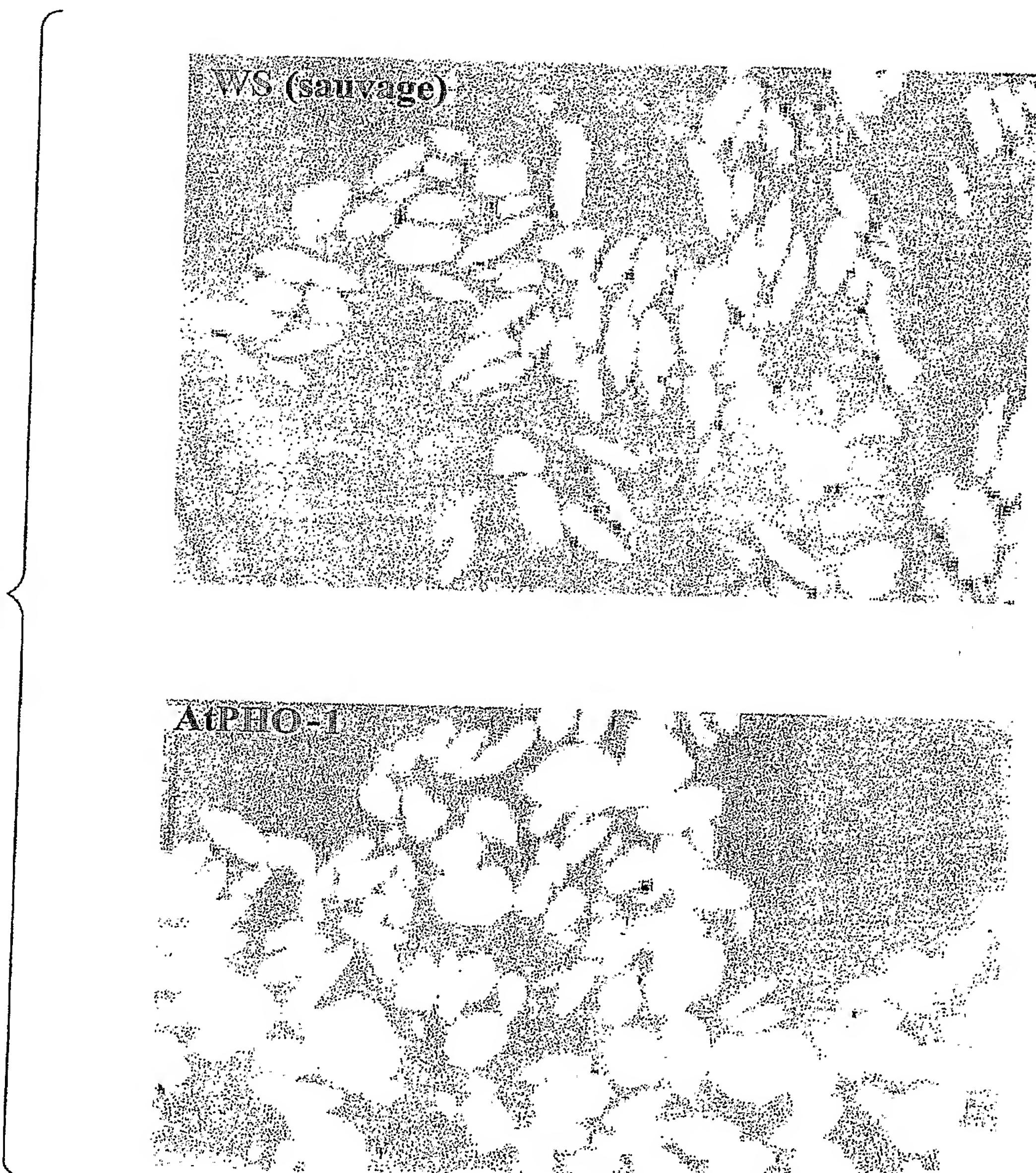


1,5 mg Amidon AtPHO-1

FIG.3

3/3

FIG.4



aaacggtgga ttggtgaga agacattgtt gctgttgctt atgatgttcc tataacctgg	1380
tataaaaacta agacaactat caatctgcgg ctctggtcaa caaaagctcc ttccgaagat	1440
tttgatttat cttcatataa ctctggaaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac	1500
gctgaaaagg tttgtatctt cattaagttt catttaagt tgctttcaca attttgtttt	1560
ttcgaccatg atctatattac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcataatctttaa	1620
aattgagtga gaaccagcag aaatgaatat gttatcacag agagattagt cttgcgtcac	1680
ttgtgcttgtt ttagataaact agctttttagt gtgtatatac tgaaaagtgg ttgttttctt	1740
cccttccctc ctgatggaat tagatttgc tcgtgcttta ccccgagat gagtcaactg	1800
aaggaaaggc tttcgtctg aagcaacaat acactctgtg ctcagcctcg ctacaagata	1860
tcgttagcactg tttttagaca aggtctggag gaaacgtcaa ctggaaagaa tttccagaga	1920
aggttgcagt gcagatgaat gacactcacc ctaccctatg cattcctgag ctaatgagga	1980
ttctaatttggaa tttaaaagga ctaagctggg aagacgcttg gaaaatcaca caaaggta	2040
aaaaatgact gaactaatttgc tacatatgtt tctattttttt cctatattta	2100
gtctctggtg cttgtcccaa ataaaagata gtttacaaga atgaaacctg caacgtgtt	2160
ctcaaaagtt aataattttt ttaggactgt ggcatacaca aaccatacag tcttgctga	2220
ggcactggag aagtggagtt tagaactcat ggagaaatttgc cttcctogtc atgtggagat	2280
tatcgaaaag attgatgagg aggtcatccc tgaacaacat atcaaatgtc tcttctattt	2340
ttttcatatc gggcttaatt tgtactttca tgtattgcag ctagttcgca caattgtttc	2400
agagtatggc accgoggatc ctgacttact tgaagaaaaa ctgaaggcaa tgaggatctt	2460
ggaaaaatgtc gagttgcctt ctgcctttgc agatgtgatc gtgaagccgg tgaacaaacc	2520
agttactgca aaagatgctc aaaatggcgt gaaaacggaa caagaagagg aaaaaactgc	2580
tggagagggaa gaggaagacg aagttatccc agaaccaaca gtagaacccc ccaagatgg	2640
ccgtatggcc aaccttgctg ttgtgggtgg tcatgctgtt aatggcggtt cagagataca	2700
cagtgaaata gtgaagcagg acgtgtttaa tgatttgcgtt caggtaaaca ttcttaactag	2760
tgaagcatga tgctataaaaa tgctctacag ggaagaacac aactctcatc gttcaatatt	2820
ctatattttt tgcagttgtg gccagaaaaa tttcagaaca aaacaaatgg agtaacacca	2880
aggcgatgga ttctgttttgc caaccatat ttaagtgata ttataactaa ctggataggc	2940
acagaagact gggcttaaa taccggaaag gttgcggaaac taagaaaggt atgtacttta	3000
tcagattcaa tttttttca catgctgttta tctttattgg ggcacattgg ttatcattgt	3060
ttggtctttc tccagtttgc agataatgaa gatctcaat ctgagtgagg ggcagcaaag	3120

aagaagaaca	agttgaaggt	tgtatcactt	atcaaggaaa	gaactggata	tactgtcagc	3180
cccgatgcaa	tgttcgacat	tcaggtcagt	tccaatggat	cttggttact	tttagattga	3240
tgagttgttt	gcttgggttt	ttcggtttga	gaagtcctt	acgcaactct	gagtagctta	3300
tgtagattct	tttcttttg	cattgaaaac	ttttgcaga	tcaagcgtat	acatgagttac	3360
aagcgacaac	tgctaaatat	cttggaaatt	gtttaccgct	acaaaaagat	gaaggaaatg	3420
agtgctagtg	agagagagaa	agcatttgtt	ccaagagttt	gcataattgg	gggaaaagca	3480
tttgccacat	atgtgcaagc	taagagaatt	gttaaattta	tcacagatgt	tgcgtctaca	3540
attaaccatg	atccagaaat	aggtgacctc	cttaaggtat	atatctactt	acgttcttgt	3600
attagtcgta	ttctcaagcg	tataacggaa	aatctgcaat	aattatctgg	ttttgcattc	3660
tgtggagatt	ggcacttact	aattagaagt	gttaactaaa	catgtaggtt	atctttgttc	3720
ctgattacaa	tgtcagtgtt	gctgaattgc	tcattccagc	aagtgagctt	tctcagcaca	3780
tcaggtaaaa	acttctttgg	cttagtcaca	ttatagttt	tggtcacaac	tccatgaagt	3840
taaaatattg	aaattgagat	aaccggtaaa	ccatgaactg	gactagtttc	tcttttttc	3900
ataagaacct	tagaaacaaa	tcctgacaca	aggaacaata	tgtttcggtt	acatttatga	3960
aaggttataa	tcaatggcac	tcatactttt	tgctggagac	taagagtttc	tctctgcagt	4020
actgctggga	tggaagctag	tggacaaggc	aacatgaaat	tttcgatgaa	cggttgcgtt	4080
ttgattggaa	ccttggatgg	ggcgaatgtc	gagattagag	aagaagttgg	agaagaaaat	4140
ttcttcctct	ttggtgccaa	agctgatcag	attgtgaacc	tcaggaagga	gagagcagag	4200
ggaaaggtat	atactatttgc	aagagttaac	cttaccatgc	ttctgttttta	gcatcaacaa	4260
gaatttgatt	tttgacctgg	ctcttggcat	tccagttgt	tcccgtcct	acttttgaag	4320
aagtcaagaa	gttcgttgg	agcggcgtct	ttggctaaa	tagctatgtat	gaactaatcg	4380
gctctttgg	aggaaacgaa	ggcttggac	gagcggatta	cttccttagtt	ggcaaagact	4440
ttccttagtta	catcgaaatgc	caagaaaaag	tcgacgaggc	ataccgagac	cagaaagtaa	4500
gtactaatgc	attttctttgc	aacatcaagc	taataatgtt	gactaaaata	tgaaacttac	4560
tcaaataatca	aaccttgaaa	ttgctgttaa	atgattacag	agatggacga	aatgtcaat	4620
aatgaacaca	gcaggttcat	tcaagtttag	cagtgaccgg	acgatccacg	aatacgccaa	4680
agacatatagg	aatattaagc	aagtggaaact	tccatga			4717

<210> 2
 <211> 10870
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>

<221> misc_feature
<222> (2040)..(8192)
<223> séquence ADN-T

<400> 2-	
atggatacga tgcaaatctc cgggttatca accggagctg aggtttaat acaatgcaat	60
tccttatcaa gcctcgtttc tcgtcgttgc gacgacggaa aatggcgaac gagaatgttt	120
ccggcgagaa acagagactt gcgtccatcg ccgacgagaa gatcctttt gtcggtgaaa	180
tctatctcta gcgaaccgaa agccaaagta accgacgcag ttctcgattc cgaacaagg	240
ctcattctaa tacttgcttt ctaataagaa ttagggtacg gaatttgaat tttatagtga	300
atgttgtgaa gtaactgatt cgtattcctt gggattttgt ttttgtgttg attgattttc	360
agaagtgttt attagctcga tgaatccgtt tgccgcagat gctgctcgg tagctcgg	420
tatcaagtac cacgcggagt ttacgccatt gttttcacccg gagaagtttg agttgccaaa	480
ggcggtcttt gcgactgcgc aaagtgttag agatgctttg atcatgaatt ggaatgcaac	540
ttatgagtagt tacaacagag tgaatgtgaa acaagcgtat tatttgtcaa tggagtttt	600
gcaggttttg gtttttactc atttctttga gtgattttgt tcttggttgt tatctaacta	660
ttttacattt taggtagag ctttatcgaa tgccgtgggt aaccttgggc ttaatagcgc	720
ttatggtagt gctttgaaga ggcttgggtt tgatttgaa agcgtggcta gtcaggtgag	780
ttgttaacca tggatttat tatgcattaa ccgtatgttta ttactaacag acgtctttaga	840
gatgatcgac tttgcgagtc tattgtttgg ttttacagag ctgttatctt ctttatatgt	900
actgagatgc tagatacttc acttccattt tgtaggagcc agatcctgca cttggaaatg	960
gtggactcgg gagacttgcc tcgtgtttt tggattccat ggcaactttg aattatccgg	1020
cttgggtta tggacttaga tacaagtatg gcttgttcaa acagagaatt acaaaagatg	1080
gacaggagga agctgcagaa gattggcttg aggttttatt ctcttattct tttctcatac	1140
agcgtttgct attgaacagt atttcttaat ttgtactctc ttgttagcaat gctgagcagt	1200
ggacatgttt attggcttac ctgtttctt cagctaagca atccttggga aatagtcaga	1260
aatgatgtct catatcctat taagttctat gggaaagtgg ttttggatc agatggtaag	1320
aaacggtgga ttgggtggaga agacattgtt gctgttgctt atgatgttcc tatacctggt	1380
tataaaacta agacaactat caatctgcgg ctctggtcaa caaaagctcc ttccgaagat	1440
tttgatttat ctcatataa ctctggaaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac	1500
gctgaaaagg tttgtatctt cattaagttt cattaaagt tgctttcaca attttgtttt	1560
ttcgaccatg atctatttac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcac atatctttaa	1620
aattgagtga gaaccagcag aaatgaatat gttatcacag agagattagt ctgcgtcac	1680

ttgtgcttgt ttatataacg agcttttatgt gtgtatatac tgaaaagtgg ttgtttctt	1740
cccttcctc ctgatggaat tagatttgct tcgtgctta ccccgagat gagtcaactg	1800
aaggaaaggc tcttcgtctg aagcaacaat acactctgtg ctcagcctcg ctacaagata	1860
tcgttagcacg ttttgagaca aggtctggag gaaacgtcaa ctggaaagaa tttccagaga	1920
aggttgcagt gcagatgaat gacactcacc ctaccctatg cattcctgag ctaatgagga	1980
ttctaatttga tttaaaagga ctaagctggg aagacgcttg gaaaatcaca caaaggtaact	2040
ggcaggatat atgccaacgt aaaaatgagg gcaatcgatt gtactgaatc ggattttcaa	2100
gggtctggcc aaaactattc cgtggcacc tggcacacgc cctggagtcg ggcccgttc	2160
cagttgaggg ttgtctacgc ttagatgaga agggaaagtgg tccaaagacga atcccagtgt	2220
cctattacca atagccgacg gtatcgataa gcttcatgtt catggtcgtat aagaaaaggc	2280
aattttaga tgttaattcc catcttggaa gaaatatagt ttaaatatattt attgataaaaa	2340
taacaagtca ggttattatag tccaaagcaaa aacataaatt tattgtatgc agtttaaatt	2400
cagaaatatt tcaataactg attatatcg ctggtagattt gccgtatgtt aaagactgag	2460
tgcgatatta tgtgtataac ataaattgtat gatatagcta gcttagctca tcggggatc	2520
catcgatcc tagacgcgtg agatcagatc tcggtgacgg gcaggaccgg acggggcggt	2580
accggcaggc tgaagtccag ctgccagaaa cccacgtcat gccagttccc gtgcttgaag	2640
ccggccgccc gcagcatgcc gcggggggca tatccgagcg cctcgtgtcat gcgcacgctc	2700
gggtcggtgg gcagcccgat gacagcgacc acgttgcgttgc agccctgtgc ctccaggac	2760
ttcagcaggt ggggttagag cgtggagccc agtcccgtcc gctgggtggcg gggggagacg	2820
tacacggtcg actcgccgt ccagtcgtat gcgttgcgtg cttccaggg gcccgcgtat	2880
gcgatgccgg cgacctcgcc gtccacctcg gcgacgagcc agggatagcg ctcccgaga	2940
cggacgaggt cgtccgtcca ctcctgcgggt tcctgcggct cggtagggaa gttgaccgtg	3000
cttgcgttcga tgtgtggtt gacgtgggt cagaccgcgc gcatgtccgc ctcgggtggca	3060
cggcgatgt cggccggcg tcgttctggg ctcatggatc cgattttag agagagactg	3120
gtgatttcag cgtgtcctct ccaaattggaa tgaacttcct tatataagg aagggtcttg	3180
cgaaggatag tgggattgtg cgtcatccct tacgtcagtgc gagatatcac atcaatccac	3240
ttgctttgaa gacgtgggtg gaacgttttc tttttccacg atgctcctcg tgggtgggg	3300
tccatctttg ggaccactgt cggcagaggc atcttgaacg atagccttcc ctttatcgca	3360
atgatggcat ttgttaggtgc caccttcctt ttctactgtc cttttgtatgc agtgcacat	3420
agctggcaaa tggaaatccga ggaggttcc cgatattacc ctttggtaaa aagtctcaat	3480

agccctttgg tcttctgaga ctgtatctt gatattctt gaggtagacga gagtgtcgtg	3540
ctccaccatg ttgacgaaga ttttcttctt gtcattgagt cgtaaaagac tctgtatgaa	3600
ctgttcgcca gtcttcacgg cgagttctgt tagatcctcg atctgaattt ttgactccat	3660
ggcctttgat tcagtaggaa ctactttctt agagactcca atctctatta ctgccttgg	3720
tttatgaagc aagccttgaa tcgtccatac tggaaatagta cttctgatct tgagaaatat	3780
atctttctct gtgttcttga tgcagttgt cctgaatctt ttgactgcat cttaacctt	3840
cttgggaagg tatttgatct cctggagatt attactcggg tagatcgtct tgatgagacc	3900
tgccgcgtag gcctctctaa ccatctgtgg gtcagcattc tttctgaaat tgaagaggct	3960
aatcttctca ttatcggtgg tgaacatggt atcgtcacct tctccgtcga actttcttcc	4020
tagatcgttag agatagagaa agtcgtccat ggtgatctcc gggcaaagg agatccgtca	4080
attccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagttag	4140
cgcaacgcaa ttaatgttag ttagctact cattaggcac cccaggctt acactttatg	4200
cttccggctc gtataatgtg tggaaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagg	4260
atcatgagcg gagaattaag ggagtcacgt tatgaccccc gccgatgacg cgggacaagc	4320
cgttttacgt ttggaactga cagaaccgca acgattgaag gagccactca gcccgggtt	4380
tctggagttt aatgagctaa gcacatacgt cagaaaccat tattgcgcgt tcaaaagtgc	4440
cctaaggta ctagacttca gcaaataattt cttgtcaaaa atgctccact gacgttccat	4500
aaattccccct cggtatccaa ttagagtctc atattcactc tcaatcaaag atccggccca	4560
tgatcatgtg gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga	4620
ggctattcgg ctagactgg gcacaacaga caatcggttg ctctgatgcc gccgtgttcc	4680
ggctgtcagc gcaggggcgc ccgggttctt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcctgaa	4740
atgaactgca ggacgaggca gcgccgtat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg	4800
cagctgtgt cgcgttgc actgaagcgg gaaggactg gctgctattt ggcgaagtgc	4860
cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg	4920
atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgate cggttacctg cccattcgac caccaagcga	4980
aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccgg tcttgcgtat caggatgatc	5040
tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgccca	5100
tgcccacgg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgtttgcgg aatatcatgg	5160
tggaaaatgg ccgttttctt ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcccggct	5220
atcaggacat agcggtggct acccggtata ttgctgaaga gcttggccgc gaatgggtgc	5280
accgcttcct cgtgttttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc	5340

gccttcttga cgagttttc tgagcggac tctgggttc gaaatgaccg accaagcgac	5400
gccccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgccgc ttctatgaaa gggtgggctt	5460
cggaatcggtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgccgggatc tcattgtggaa	5520
gttcttcgac cacccctgc tttaatgaga tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt	5580
tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa aaacctgagc atgtgttagct cagatcctta	5640
ccggccggttt cggttcattt taatgaatat atcacccgtt actatcgat ttttatgaat	5700
aatattctcc gttcaattt ctgattgtac cctactactt atatgtacaa tattaaaatg	5760
aaaacaatat attgtgctga ataggttat agcgacatct atgatagagc gccacaataa	5820
caaacaattt cggttttatta ttacaaatcc aattttaaaa aaagcggcag aaccggtaaa	5880
acctaaaaaga ctgatttacat aaatcttatt caaatttcaa aaggccccag gggctagtat	5940
ctacgacaca ccgagcggcg aactaataac gttcactgaa gggactccg gttcccccgc	6000
ggcgcgcatg ggtgagattt cttgaagttt agtattggcc gtccgctcta ccgaaagtta	6060
cgggcaccat tcaacccggt ccagcacggc ggccgggtaa ccgacttgct gccccgagaa	6120
ttatgcagca ttttttttgtt gtatgtggc cccaaatgaa gtgcaggta aaccttgaca	6180
gtgacgacaa atcggttgtt gggccaggc cgaattttgc gacaacatgt cgaggctcag	6240
caggggctcg atccctcgat tcgaatttca tcttagtaaca tagatgacac cgcgcgcat	6300
aatttatcct agtttgcgcg ctatattttt ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc	6360
gggactctaa tcataaaaaac ccatctcata aataacgtca tgcattacat gttattttt	6420
acatgcttaa cgtaatttcaa cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga	6480
ttcaatctta agaaacttta ttgcacaaatg tttgaacgat cgagctcaat tccccaccga	6540
ggctgttagcc gacgatggtg cgccaggaga gttgttgatt cattgtttgc ctccctgctg	6600
cggttttca ccgaagttca tgccagtcca gcgttttgc agcagaaaaag ccggccactt	6660
cggtttgcgg tcgcgagtga agatccctt cttgttaccg ccaacgogca atatgccttg	6720
cgaggtcgca aaatcggcga aattccatac ctgttacccg acgacggcgc tgacgcgatc	6780
aaagacgcgg tgatacatat ccagccatgc acactgatac tcttcactcc acatgtcggt	6840
gtacatttgcgg tgcagccgg ctaacgttac cacgcccgtat tcgggtatga taatcggt	6900
atgcagtttcc tcctgccagg ccagaagttc tttttccagt accttctctg ccgtttccaa	6960
atcgccgctt tggacatacc atccgtataa acggttcagg cacagcacat caaagagatc	7020
gctgatggta tcgggtgttag cgtcgacaa cattacattt acgcaggta tcggacgcgt	7080
cgggtcgagt ttacgcgttg cttccggccag tggcgaaata ttcccgatca cttgcggacg	7140

ggtatccggt tcgttggcaa tactccacat caccacgctt gggtggttttgtcacgcgc	7200
tatcagctcttaatcgccgtaaagtgcgc ttgctgagtt tccccgttga ctgccttttc	7260
gctgtacagt tcttcggct tttgcccgc ttcaaaacca atgcctaaag agaggtaaa	7320
gccgacagca gcagtttcat caatcaccac gatgccatgt tcatactgccc agtcgagcat	7380
ctcttcagcg taaggtaat gcgaggtacg gtaggagttg gccccaatcc agtccattaa	7440
tgcgtggtcg tgcaccatca gcacgttatac gaatcctttg ccacgtaagt ccgcatacttc	7500
atgacgacca aagccagtaa agtagaacgg tttgtggta atcaggaact gttggccctt	7560
cactgccact gaccggatgc cgacgcgaag cgggtagata tcacactctg tctggcttt	7620
ggctgtgacg cacagttcat agagataacc ttcacccggt tgccagaggt gcggattcac	7680
cacttgcaaa gtcccgctag tgccttgccttcc agttgcaacc acctgtttagt ccgcatacag	7740
cagttcaacg ctgacatcac cattggccac cacctgccag tcaacagacg cgtggttaca	7800
gtcttgcgcg acatgcgtca ccacggtgat atcgccacc caggtgttcg gcgtgggtgt	7860
gagcattacg ctgcgtatggatcccgatata gttaaagaaa tcatggaagt aagactgctt	7920
tttcttgcgg tttcgtcgg taatcaccat tccggcggtt atagtctgcc agttcagttc	7980
gttggttcaca caaacggtaa tacgtacact tttccggca ataacatacg gcgtgacatc	8040
ggcttcaaat ggcttatagc cgcctgatg ctccatcaact tcctgattat tgacccacac	8100
tttgcgttaa tgagtgaccg catgaaacg cagcacgata cgctggctg cccaacctt	8160
cggtataaag acttcgcgtt gataccagac gttaaaaatg actgaactaa ttgtcggca	8220
tgctacatat gtgtcttattt gttcttatat tttagtctctg gtgcttgcctt caaataaaag	8280
atagttaca agaatgaaac ctgcaacgtt tttctcaaaa gttataatt tttttaggac	8340
tgtggcatac acaaaccata cagtcgttgc tgaggactg gagaagtggaa gtttagaact	8400
catggagaaa ttgcttcctc gtcgtatggaa gattatcgaa aagattgtatg aggaggtcat	8460
ccctgaacaa catatcaaattt gtcttttcta ttttttcat atcgggtcta atttgtactt	8520
tcatgtattt cagcttagttc gcacaattgt tttagtgc ggcacccggg atcctgactt	8580
acttgaagaa aaactgaagg caatgaggat ttggaaaat gtcgttgc cttctgcctt	8640
tgcagatgttgcgtatggaa accagttact gcaaaagatg ctcaaaatgg	8700
cgtggaaacg gaacaagaag agggaaaaac tgctggagag gaagaggaag acgaagttat	8760
cccagaacca acatgaaac ccccaagat ggtccgtatg gccaaccttg ctgttgcgg	8820
tggtcatgttgcgtatggcg ttgcgtatggaa acatgttgcgtatggaa atagtgttgcgtt	8880
taatgatttc gtacaggtaa acattctaac tagtgaagca tgcgtatggaa atatgttgcgtt	8940
cagggaaagaa cacaactctc atcgttcaat attcttatatt ttttgcgttgcgtatggaa	9000

aaatttcaga acaaaaacaaa tggagtaaca ccaaggcgat ggattcgtt ttgcaaccca	9060
tatttaagtg atattataac taactggata ggcacagaag actgggtctt aaataccgaa	9120
aagggttgcgg aactaagaaa ggtatgtact ttatcagatt caatgttgaa tcacatgctg	9180
ttatcttat tggcgacat tggttatcat tggttggctt ttctccagtt tgcagataat	9240
gaagatctcc aatctgagtg gagggcagca aagaagaaga acaagttgaa gggtgtatca	9300
cttatcaagg aaagaactgg atatactgtc agccccgatg caatgttcga cattcaggtc	9360
agttccaatg gatcttggtt acttttagat tgatgagttg tttgottggg ttttcggtt	9420
tgagaagtcc tttacgcaac tctgagtagc ttatgttagat tctttcttt ttgcattgaa	9480
aacttttgc agatcaagcg tatacatgag tacaagcgac aactgctaaa tatcttggga	9540
attgtttacc gctacaaaaaa gatgaaggaa atgagtgcta gtgagagaga gaaagcattt	9600
gttccaagag tttgcatatt tggggaaaaa gcatttgcca catatgtgca agctaagaga	9660
attgttaat ttatcacaga tggcggtct acaattaacc atgatccaga aataggtgac	9720
ctccttaagg tatatatcta cttacgttct tgtattagtc gtattctcaa gcgtataacg	9780
gaaaatctgc aataattatc tggttttgc atctgtggag attggcactt actaattaga	9840
agtgttaact aaacatgtag gttatcttg ttccctgatta caatgtcagt gttgctgaat	9900
tgctcattcc agcaagttag ctttcgtc acatcaggta aaaacttctt tggcttagtc	9960
acattatagt ttttggtcac aactccatga agtaaaata ttgaaattga gataaccggt	10020
aaaccatgaa ctggactagt ttctttttt ttccataagaa cttagaaac aaatcctgac	10080
acaaggaaca atatgtttcg gttacattta tgaaaggta taatcaatgg cactcatact	10140
ttttgctgga gactaagagt ttctctctgc agtactgctg ggatggaagc tagtggaca	10200
agcaacatga aattttcgat gaacggttgc gtttgattt gAACCTTGA TGGGGCGAAT	10260
gtcgagatta gagaagaagt tggagaagaa aatttcttcc tctttggcgc caaagctgat	10320
cagattgtga acctcaggaa ggagagagca gaggaaagg tataactat ttgaagagtt	10380
aaccttacca tgcttctgtt ttagcatcaa caagaatttgc attttgacc tggctttgg	10440
cattccagtt tgttcccgat cctacttttgc aagaagtcaa gaagttcggtt ggaagcggcg	10500
tctttggctc aaatagctat gatgaactaa tcggctttt ggaaggaaac gaaggctttg	10560
gacgagcggaa ttacttccta gttggcaaag actttcttag ttacatcgaa tgccaaagaaa	10620
aagtcgacga ggcataccga gaccagaaag taagtactaa tgcattttct ttgaacatca	10680
agctaataat gttgactaaa atatgaaact tactcaaata tcaaaccctg aaattgctgt	10740
taaatgatta cagagatgga cgagaatgtc aataatgaac acagcagggtt cattcaagtt	10800

tagcagtgc acggacgatcc acgaatacgc caaagacata tggaatatta agcaagtgg 10860
acttccatga 10870

